

REC'D 03 JAN 2001

WIPO

PCT

日本国特許庁 PCT/JPC0/07917

PATENT OFFICE

JAPANESE GOVERNMENT

10.11.00

JP00/7917

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2000年 5月16日

出願番号

Application Number:

特願2000-144020

出願人

Applicant(s):

山之内製薬株式会社

財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

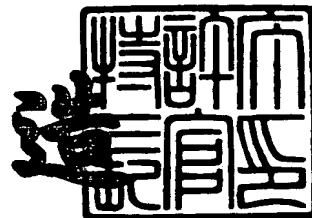
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月15日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3103637

【書類名】 特許願

【整理番号】 WP32802941

【提出日】 平成12年 5月16日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 新規なアグリカナーゼ

【請求項の数】 13

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 山地 昇

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 西村 耕一

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 阿部 邦威

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県木更津市請西 2 丁目 2 0 番 2 5 号

    【氏名】 小原 収

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県木更津市清見台南 5 丁目 1 番 2 6 号 オータニガ  
    ーデンハウス B - 4

    【氏名】 長瀬 隆弘

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県木更津市八幡台 5 丁目 2 番 1 1 号

    【氏名】 野村 信夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000006677

    【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 596175810

【氏名又は名称】 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

【識別番号】 100088616

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 一平

【電話番号】 03-5820-0535

【選任した代理人】

【識別番号】 100089200

【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

【識別番号】 100098501

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 拓

【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【電話番号】 03-5916-5111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009689

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特 2 0 0 0 - 1 4 4 0 2 0

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704254

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なアグリカナーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ。

【請求項2】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ。

【請求項3】 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ。

【請求項4】 アグリカナーゼ活性を有する請求項1乃至3の何れか1項に記載の金属プロテアーゼ。

【請求項5】 請求項4記載の金属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該アグリカナーゼ活性を修飾する物質をスクリーニングする方法。

【請求項6】 請求項1乃至3の何れか1項に記載の金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項7】 請求項6記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項8】 請求項7記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項9】 請求項8記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求項1乃至3の何れか1項に記載の金属プロテアーゼの製造方法。

【請求項10】 請求項1乃至3の何れか1項に記載の金属プロテアーゼに対する抗体。

【請求項11】 請求項1乃至3の何れか1項に記載の金属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼの活性を修飾

する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 1 2】 請求項4記載の金属プロテアーゼを阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制剤。

【請求項 1 3】 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物である遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規金属プロテアーゼ、該金属プロテアーゼをコードする遺伝子、該金属プロテアーゼの製造方法、該金属プロテアーゼを用いたアグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング方法、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼを阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制剤、及び該金属プロテアーゼのプロモーター遺伝子に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

関節疾患は、関節軟骨の損傷・変性を主病変とする疾患である。関節疾患の中で最も患者数の多い疾患は変形性関節症（OA）であるが、現行の治療法においては鎮痛消炎剤やヒアルロン酸製剤が軟骨変性・軟骨下骨破壊に伴う痛みを軽減する目的で対症療法的に用いられているに過ぎず、十分な治療効果を上げているとは言えない状況にある。

関節軟骨は主にII型コラーゲンと軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンから構成される組織であり、関節疾患では両者の分解・変性が観察されている。そのため、古くよりこれら細胞外マトリクス成分の分解・変性の制御が関節疾患の治療に繋がると考えられており、分解に関与するプロテアーゼ（コラゲナーゼ、アグリカナーゼ）の同定、そして、それらに対する阻害剤の探索、医薬品としての開発の試みが精力的に行われてきた。

コラゲナーゼ活性を有するプロテアーゼとしてはマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP1、MMP8、MMP13、MMP14等）が同定され、それぞれの選択的阻害剤が発見されていた。しかしながら、多数のコラゲナーゼ阻害活性を有するMMP阻害剤

をOA、リウマチ性関節炎（RA）を含む関節疾患治療薬として開発する動きがあったにもかかわらず、これらの疾患を適応症とするMMP阻害剤は上市されていなかった。このような状況下、関節軟骨のもう一つの主要構成成分であるアグリカンを選択的に分解するアグリカナーゼが注目された。

#### 【0003】

アグリカンのGlu373-Ala374の間を切断する酵素アグリカナーゼが関節疾患に関与することは、SandyらやLohmanderらのヒト関節疾患患者の滑液中に検出される主要なアグリカン分解断片がいずれもアグリカナーゼ切断部位での切断により生じているとした論文で明らかにされていた（Sandy J. D. et al, J Clin. Invest. 89, 1512-1516, 1992; : Lohmander L. S. et al, Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993）。一方、関節軟骨の体外移植培養系において、IL-1誘導により、まずアグリカンの分解が起こり、続いてII型コラーゲンの分解が亢進することが知られていた（Dingle L. T. et al., Ann. Rheum. Dis. 34, 303-311, 1975; Cawston T. E. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 215, 377-385, 1995; Kozaci L. D. et al., Arthritis Rheum. 40, 164-174, 1997）。マウス関節炎モデルにおいてもアグリカン分解がII型コラーゲン分解に先行することが報告されていた（van Meurs J. B. et al., Arthritis Rheum., 42, 1128-1139, 1999）。これらのことは、先行するアグリカン分解を阻害することによりII型コラーゲン分解をも制御しうる可能性を示唆していた。

#### 【0004】

ところが、金属プロテアーゼであること、細胞外に存在すること、基質認識に糖鎖の関与があること、IL-1、TNF、レチノイン酸で活性が誘導されること等の生化学的性質が分かっていたにも係わらず、アグリカナーゼの本体は長い間不明のままであった。最近になり、ADAMTS4 (aggrecanase-1; Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999)、ADAMTS11 (aggrecanase-2; Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) が上述のアグリカナーゼ活性を有するプロテアーゼとして報告された。しかし、これらはヒトOA軟骨で遺伝子発現増強されておらず、また、ヒト膝関節軟骨の体外移植培養系においてアグリカナーゼ活性を誘導するIL-1、TNF、レチノイン酸で遺伝子発現誘導

されないことから、関節疾患に関する別のプロテアーゼの存在が示唆されていた (Flannery C. R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999)。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、関節疾患、なかでも特に最も患者数の多い疾患である変形性関節症の発症・進行に関与するアグリカナーゼをコードする遺伝子を単離・同定し、それらの発現生産系を構築し、組換え蛋白を提供すること、さらには該アグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング系を構築し該物質の探索を可能にすること、そして、該物質のプロテオグリカン分解抑制作用を示すことを目的とする。

#### 【 0 0 0 6 】

##### 【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、ADAMTSファミリーに分類される新規蛋白をコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、組み換え蛋白の生産を可能にすることに成功した。

さらにまた、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同新規蛋白の製造法を確立した。これにより、該蛋白のプロテアーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニングを可能にし、本発明を完成した。

加えて、該蛋白はプロテアーゼ活性のうちの1つである細胞外基質アグリカンでGlu373-Ala374の間で選択的に切断する活性、すなわちアグリカナーゼ活性を有することを見だし、このことより該蛋白及び該蛋白の活性を有意に修飾する化合物の医薬品としての可能性が示唆された。

次いで、該蛋白のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する化合物を発見し、関節軟骨初代培養細胞を用いた系で該化合物がプロテオグリカン分解抑制作用を有することを示し、本発明を完成させた。

#### 【 0 0 0 7 】

即ち本発明は、



- (1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ、
- (2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ、
- (3) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ、
- (4) アグリカナーゼ活性を有する(1)乃至(3)の何れかに記載の金属プロテアーゼ、
- (5) (4) 記載の金属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該アグリカナーゼ活性を修飾する物質をスクリーニングする方法、
- (6) (1) 乃至(3)の何れかに記載の金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子、
- (7) (6) 記載の遺伝子を含むベクター、
- (8) (7) 記載のベクターを含む宿主細胞、
- (9) (8) 記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、(1) 乃至(3)の何れかに記載の金属プロテアーゼの製造方法、
- (10) (1) 乃至(3)の何れかに記載の金属プロテアーゼに対する抗体、
- (11) (1) 乃至(3)の何れかに記載の金属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼの活性を修飾する物質をスクリーニングする方法、
- (12) (4) 記載の金属プロテアーゼを阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制剤、
- (13) 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物である遺伝子、

に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「金属プロテアーゼ」は、亜鉛コンセンサス配列 (HEx xH) を有し、プロテアーゼ活性を有する「金属プロテアーゼ」を意味する。また、「プロテアーゼ」は断りがない限り、「蛋白」を表す。

本発明の新規金属プロテアーゼは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼならいずれでもよい。

また、本発明の新規金属プロテアーゼは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼならいずれでもよい。

さらに、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有し、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼならいずれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物」とは、(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼの同効物の場合、第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、(2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼの同効物の場合、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位におい

て、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、(3)配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有し、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼの同効物の場合、それぞれの配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、

である。「金属プロテアーゼの同効物」として好ましくは、SNPなどのアミノ酸置換で生じた該金属プロテアーゼを示す。

本発明の新規金属プロテアーゼとして好ましくは配列番号1記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、特に配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

#### 【0009】

また、本発明の新規金属プロテアーゼをコードする遺伝子は、上記の金属プロテアーゼをコードする塩基配列を含む遺伝子、即ち、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列で示される金属プロテアーゼ、又は該金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ遺伝子ならいずれでもよい。

また、本発明の新規金属プロテアーゼをコードする遺伝子は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列で表される金属プロテアーゼ、又は該金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ遺伝子ならいずれでもよい。

さらに、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列で示される金属プロテアーゼ、又は該金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列を有し、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ遺伝子ならいずれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列」とは、(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列の場合、第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼをコードする塩基配列、

(2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列の場合、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼをコードする塩基配列、(3) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有し、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列の場合、それぞれの配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼをコードする塩基配列、

である。「金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列」として好ましくは、SNPなどのアミノ酸置換で生じた該金属プロテアーゼをコードする塩基配列を示す。

本発明の新規金属プロテアーゼをコードする遺伝子として好ましくは、配列番

号2記載の塩基配列の1番から1749番、1番から2850番、637番から1749番若しくは637番から2850番を有する遺伝子であり、特に好ましくは配列番号2記載の塩基配列の637番から1749番、637番から2850番を有する遺伝子である。

本発明にはプロモーター遺伝子が存在するが、本発明のプロモーター遺伝子として好ましくは配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列を有する遺伝子である。ここで、「配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の遺伝子の同効物である遺伝子」とは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至複数個の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていてもよい。

本発明の新規金属プロテアーゼはさまざまなプロテアーゼ活性を有しているが、その中の1つであるアグリカナーゼ活性を有する点が特に注目すべき点である。

さらに、本発明のアグリカナーゼ活性を有している金属プロテアーゼはアグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニングに使用することができる。該アグリカナーゼ活性を有している金属プロテアーゼを修飾する物質のうち、該アグリカナーゼ活性を阻害する物質は、プロテオグリカン分解抑制剤として有用である。加えて、本発明において該金属プロテアーゼのプロモーター遺伝子には複数のバリエーションが存在する。したがって、目的に応じて所望とするそのプロモーター遺伝子のバリエーションを用いて、プロモーター活性を修飾する物質をスクリーニングすることができる点が注目すべき点である。

#### 【0010】

ここで、本発明の新規蛋白をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白の製造方法、本発明の新規蛋白の活性を検出する方法、本発明の新規蛋白に反応する抗体の製造方法、本発明の新規蛋白の活性を修飾する物質のスクリーニング方法、プロモーター活性を検出する方法、プロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法を以下の1)～9)に記載する。本発明には1)～9)に記載する事項全てを包含する。

#### 【0011】

##### 1) 蛋白遺伝子の製造方法

## a) 第 1 製造法—PCRを用いた方法

本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該新規蛋白 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ 2 種類のプライマーを作製する。denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白のそれぞれに適した逆転写酵素—ポリメラーゼ連鎖反応（以下 RT-PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。もしくは、本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から調製した mRNA から逆転写酵素により作製した cDNA あるいは市販の該ヒト細胞あるいは組織由来の cDNA を鋳型とした、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該新規蛋白を製造することができる。

まず、本発明の新規蛋白の産生能力を有する細胞あるいは組織から該プロテアーゼをコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート—グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該プロテアーゼの産生能力を有する細胞あるいは組織は、該プロテアーゼをコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、該プロテアーゼに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ（d T）セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出精製済みの mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー、オリゴ d T プライマーまたはカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いて PCR に供し、目

的とする新規蛋白DNAを増幅する。また、cDNAを合成せずとも、市販のcDNAを用いてもよい。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

### 【 0 0 1 2 】

#### b) 第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得たmRNAを鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としてはS1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. et al., Cell, 7, 279-288, 1976)、Land法(Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、Okayama-Berg法(Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982)などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えばDH5 $\alpha$ 株、HB101株、JM109株等に導入して形質転換させて、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合にはHanahanの方法(Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわちCaCl<sub>2</sub>やMgCl<sub>2</sub>またはRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNA体を加える方法により実施することができる。もちろん、市販のコンピテント細胞を使用しても構わない。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規蛋白のDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

### 【 0 0 1 3 】

#### ① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌク

レオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる）、これをプローブ（ $^{32}\text{P}$ 又は $^{33}\text{P}$ で標識する）として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。

② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法  
本発明の新規蛋白の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al., Science 239, 487-491, 1988)を行い、目的の新規蛋白の全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、該新規蛋白を産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNAを断片を $^{32}\text{P}$ 又は $^{33}\text{P}$ で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

### ③ 他の動物細胞で新規蛋白を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞外に産生させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて該新規蛋白を検出することにより、元の形質転換株より目的の新規蛋白をコードするcDNAを有する株を選択する。

### ④ 本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株の培養上清、細胞内もしくは細胞表面に蛋白を産生させ、本発明の新規蛋白に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用いて、所望の新規蛋白産生株を検出し、目的の株を選択する。

### ⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にプロットし



、本発明の新規蛋白産生細胞からのmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の新規蛋白をコードするDNAを採取する方法は、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)等の遺伝子操作実験マニュアルに従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

#### 【0014】

##### c) 第3製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機[例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など]を用いて合成することができる。

#### 【0015】

##### d) 第4製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、新規蛋白の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al., Nature, 10, 105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis) (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984)等に従うことができる。

#### 【0016】

以上、a)乃至d)により得られるDNAの配列決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980)やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白は、下記の方法によって得ることができる。

#### 【 0 0 1 7 】

### 2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白の組み換え蛋白の製造方法

単離された本発明の新規蛋白をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクター-DNAに再び組込むことにより、真核生物および原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. Cell, 23, 175-182, 1981)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞にEpstein Barr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) 等がよく用いられるが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S., et al. Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトのelongation factorプロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4(Invitrogen社製)等を例示できるが、これらに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y., *Med. Immunol.*, 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322, 1990)、pCDM8 (Seed, B., *Nature*, 329, 840-842, 1987) 等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G., *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Ed, A. J., *Virology*, 52, 456-457, 1973)、FuGENE<sup>TM</sup>6 Transfection Reagent (Boeringer Mannheim社製) を用いた方法、および電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1, 841-845, 1982) 等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

#### 【 0 0 1 8 】

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) や pSV2-neo (Southern, P. J. and Berg, P., J., *Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより新規蛋白を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4 (Invitrogen社製) などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞外に本発明の新規蛋白が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に必要に応じ牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したものを使用で

きる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞の細胞外に生産される本発明の新規蛋白は、該新規蛋白の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該新規蛋白を含む培養液を通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の新規蛋白はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該新規蛋白の発現の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。また、マーカー配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

#### 【 0 0 1 9 】

### 3) 本発明の新規蛋白の金属プロテアーゼ活性を検出する方法

本発明の新規蛋白およびその部分ペプチドのプロテアーゼ活性は、本発明の新規蛋白およびその部分ペプチドと以下に挙げる基質とを適当な緩衝液中で混合し、反応させた後、それぞれの基質にあった方法で検出することができる。

基質としては、蛍光若しくは放射線標識の基質、蛍光団、消光団若しくは発色団を有する合成基質、および非標識の基質等が挙げられる。蛍光若しくは放射線標識の基質としては、蛍光若しくは放射線標識されたゼラチン、コラーゲンや合成ペプチド等、蛍光団を有する合成基質としては、Glt-Ala-Ala-Phe-MCA、Lys-MCA、Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA等（ペプチド研究所）、消光団を有する合成基質としては、MOCac-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met(Dnp)-NH<sub>2</sub>、MOCac-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)-NH<sub>2</sub>等（ペプチド研究所）、発色団を有する合成

基質としては、Ala-pNA、Bz-Tyr-pNA、Pyr-Phe-Leu-pNa等（ペプチド研究所）、非標識の基質としては、カゼイン、コラーゲン、フィブロネクチン、アグリカン、ゼラチン等の蛋白、インスリン等の生理活性ペプチドや合成ペプチド等が挙げられる。合成ペプチドとは非天然型アミノ酸を含むものも含有する。

たとえば、放射線標識した基質や蛍光団、消光団、発色団を有する基質を用いる場合は、液体シンチレーションカウンター、蛍光検出器、分光光度計等、適当な検出器を用いることにより、プロテアーゼ活性を検出することができる。非標識の基質を用いる場合は、SDS-PAGE、HPLC、Zymography等で分解物を判別でき、プロテアーゼ活性を検出することができる。

#### 【0020】

##### 4) アグリカナナーゼ活性を検出する方法

アグリカナナーゼ活性を検出するための基質としては、ヒトもしくは他の動物の軟骨・組織より精製したアグリカン、あるいは遺伝子組換えアグリカン、市販のアグリカン（生化学工業）、もしくはそれらの部分蛋白を用いることができる。これらの基質と被試験プロテアーゼを含む細胞・組織培養液、細胞・組織抽出液もしくは（部分）精製標品を反応させ、Glu373-Ala374の間で切断された断片を検出することによりアグリカナナーゼ活性を測定することができる。Glu373-Ala374の間で切断された断片の検出には、常法に従い分解断片のN末端配列もしくはC末端配列を決定する手法や、より簡便にGlu373-Ala374の間で切断されることにより生じるC末端のNITGE、N末端のARGSVを特異的に認識する抗ネオエピトープ抗体（Hughes C. E. et al., Biochem J., 305, 799-804, 1995）を用いたELISA（Enzyme Linked Immuno Solvent Assay）やウエスタンブロッティング等の免疫学的手法を用いることができる。

#### 【0021】

##### 5) 本発明の新規蛋白に反応する抗体の作製方法

本発明の新規蛋白に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該新規蛋白や該新規蛋白の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明新規蛋白をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いてDNAワクチン法（Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9

519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル最小必須培地、ダルベッコ修飾最小必須培地、RPMI-1640などの通常よく用いられているものに適宜10～30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株はHAT選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で数日間、あるいはプリスタンで前

処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10～20日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部を含む抗体断片、例えば、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab'、Fvを得ることができる。

さらには、本発明新規蛋白に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法 (Clackson, T. et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) によりsingle chain FvやFabとして得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

#### 【 0 0 2 2 】

#### 6) 本発明の新規蛋白の金属プロテアーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング方法

本発明のスクリーニング方法は、少なくとも前記1) 及び2) で示される製造法で調製された新規蛋白を用いて、該新規蛋白の生化学的な特性に応じた新規蛋白の金属プロテアーゼ活性の修飾の指標を測定する系に被験物質を添加し、該指標を測定する手段を含む。ここで、該測定系としては、公知の各種プロテアーゼ測定系 (鶴 大典・船津 勝編 生物化学実験法30 「蛋白質分解酵素I」 学会出版センター、1993、同31 「蛋白質分解酵素I」 学会出版センター、1993) を挙げることができ、該文献に記載された処理方法に従い、あるいは準じて、あるいは応用して実施することにより被験物質のスクリーニングを行うことができる。

被験物質としては従来金属プロテアーゼ阻害活性を有することは知られているが該新規蛋白の金属プロテアーゼ活性に対して修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) や通常

の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いる。

本発明の新規蛋白のプロテアーゼ活性を修飾する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、本発明の新規蛋白またはその部分ペプチドの基質となるものであればいずれのものでも使用可能であり、好ましくは前記 3）に記載の基質である。

#### 【 0 0 2 3 】

7) 本発明の新規蛋白のアグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング方法

4) に示したアグリカナーゼ活性の検出法と同様の方法でスクリーニングが可能である。また、本発明の新規蛋白と反応させることにより分解され消滅・減少する添加したアグリカン、組換えアグリカン、市販のアグリカン、もしくはそれらの部分蛋白量を、アグリカナーゼで切断される部位のN側およびC側部分のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて計測する（実施例10-2）に例示するようなELISAなどの方法を用いることができる。さらには、本発明の新規蛋白と（実施例7-1）に例示するようなN末にFLAGタグ、C末にHisタグが付加した組換えアグリカンに反応させて分解され消滅・減少する添加した組換えアグリカン量を抗FLAGタグ、抗HISタグ抗体を用いたELISA等で計測する方法が用いられる。この場合のタグはFLAGタグおよびHisタグに限定されず、また、組換えアグリカンは（実施例7-1）に限定されず、本蛋白によりアグリカナーゼ切断部位で切断されるアグリカンの部分蛋白もしくは改変蛋白であればよい。アグリカナーゼ活性に用いる被験物質は、6) の金属プロテアーゼ活性で用いる被験物質と同様の物質が用いられる。

#### 【 0 0 2 4 】

8) プロモーター活性を検出する方法



実施例に示した配列およびその部分配列が有するプロモーター活性を検出する方法としては、レポーター遺伝子プラスミドを用いる方法が簡便である。レポーター遺伝子とは通常的手段（例えば、酵素活性の測定等、当業者に既知の定量法）によって定量することができる蛋白をコードする遺伝子を指し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ遺伝子がよく用いられているがこれらに限定されない。レポーター遺伝子プラスミドを構築する基となるベクターに関しては制限はなく、市販のプラスミドベクター、例えば、pGV-B2（東洋インキ社製）やpSEAP2-Basic（Clontech社製）などを用いることができる。これらのベクターのレポーター遺伝子上流に当該配列を順方向に挿入したレポーター遺伝子プラスミドを構築し、このプラスミドで形質転換した細胞において発現されるレポーター蛋白の量をそれぞれに適した方法で測定することにより当該配列のプロモーター活性の有無、強度を知ることができ、また、上記形質転換細胞の培養液に被験物質を添加することにより、被験物質の当該プロモーター活性に及ぼす作用を検出することができる。

#### 【0025】

#### 9) 本発明のプロモーター活性を修飾する物質のスクリーニングの方法

本発明の配列番号の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を修飾する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、8)に示したプロモーター活性を検出する方法と同様の方法を用いることができる。被験物質としては従来プロモーター活性を修飾することは知られているが配列番号24乃至31の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法（Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作製されたランダム・ペプチド群、抗体及び抗体断片を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング

法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用い得る。

# 【 0 0 2 6 】

本発明には、新規蛋白または前記スクリーニング法により選択された新規蛋白の活性を有意に修飾する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のうち、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの活性を有意に阻害する物質を有効成分とする医薬が包含され、特に医薬として好ましくはプロテオグリカン分解抑制剤である。新規蛋白の活性を有意に阻害する物質としては、（実施例10-2）で示されるスクリーニング系で選択された、W090/05719に収載された公知化合物が挙げられるが、本発明はその公知化合物を有効成分とする医薬に限らず、新規蛋白の活性を有意に阻害する物質を有効成分とする物質であれば全て包含される。尚、W090/05719に収載された公知化合物の製造方法については、該国際公開公報の製造法に準じて合成することができる。

本発明の新規蛋白、新規蛋白の活性を有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体または抗体断片）を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注、関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

# 【 0 0 2 7 】

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 8 0 等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

#### 【 0 0 2 8 】

##### 【実施例】

以下、本発明を更に具体的に説明する。

特に断りのない限り、公知の方法 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マニュアルに従ったが、本発明は実施例に限定されるものではない。

#### 【 0 0 2 9 】

(実施例 1) 新規 ADAMTS 遺伝子 MDTS6 の部分配列の発見

ヒト脳由来 cDNA ライブラリーは文献 (Ohara O. et al., DNA Res., 4, 53-59, 1997) に示すように挿入配列の大きさによって厳密に分画されたものを構築した。これらのサブライブラリーの cDNA 断片のサイズ分布は 3kb - 8kb である。このライブラリーを構成するクローンの 5'-及び 3'-末端の配列を解読し、自家製の EST データバンクを構築した。この中から、MDTS6 の部分配列を得た。

#### 【 0 0 3 0 】

## (実施例 2) MDTS6の全長ORF配列の決定

MDTS6のcDNAクローンの配列を決定することにより、配列番号2の832番から2853番の配列を得た。配列番号2の1番から831番の配列は、Clontech社製のヒト脳およびヒト胎盤のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNAを鋳型、LA-Taq<sup>TM</sup> (宝酒造社製) をDNAポリメラーゼとして、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を繰り返すことにより取得した。その結果、全長MDTS6は、配列番号1に示すように950アミノ酸からなる新規蛋白であることが判明した。そのドメイン構造はN末から、分泌シグナル配列、プロ領域、furinプロテアーゼ認識配列、金属プロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、トロンボスポンジン I 型繰り返し配列 (以下、TSP-1繰り返し配列という)、Cys残基に富むドメイン、中間領域、TSP-1繰り返し配列2個であり、ADAMTSファミリーに属する分子であった (Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Tang, B. L. et al., FEBS Lett., 445, 223-225, 1999)。

## 【 0 0 3 1 】

## (実施例 3) C末FLAG付加型発現ベクターの作製

pCEP4 (Invitrogen社製) を制限酵素ClaI、NsiIで切断し、平滑末端化後、自己連結反応を行い、EBNA1発現ユニットを除去した発現ベクターpCEP4dを作製した。このベクターを制限酵素NheI、BamHIで切断し、アガロースゲル抽出した約7.7Kbaの断片に、配列番号3で示される核酸と配列番号4で示される核酸をアニールさせた重鎖オリゴヌクレオチドを挿入して、目的の配列を有するクローンを選択し、pCEP4d-FLAGと命名した。このベクターを鋳型、配列番号5で示されるオリゴDNA、配列番号6で示されるオリゴDNAをプライマーとして、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行った。生じた約0.4kbpのDNA断片を制限酵素SpeIで切断し、XbaIで切断したpCEP4d-FLAG (約7.7Kbp) に挿入し、目的通りプロモーターよりクローニングサイトのXbaI、NheI、NotI、BamHI認識配列そしてFLAGタグという順になっているクローンを選択して、pCEP4dE2-FLAGを完成した。

## 【 0 0 3 2 】

## (実施例 4) MDTS6短長蛋白 (MDTS6TSP1) 発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から583番 (MDTS6のN末からTSP1繰り返し配列を含む領域 (以

下MDTS6TSP1とする)に相当する部分)をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1番から1749番の遺伝子をPCRにより取得した。配列番号7と配列番号8で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNAを鋳型、LA-Taq<sup>TM</sup> (宝酒造社製)をDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを10回行った。この反応液を50倍希釈したDNA溶液を鋳型として、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼを用い、94℃2分の後、98℃10秒、66℃30秒、74℃4分のサイクルを40回、続いて72℃10分の条件でPCRを行った。こうして生成した5'側にXbaI認識配列およびKozak配列を、3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認した後、制限酵素XbaI、NotIで切断し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS6TSP1-FLAGを完成した。

### 【 0 0 3 3 】

(実施例5) MDTS6全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から950番をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1534番から2850番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、配列番号9と配列番号10で示されるオリゴDNAをプライマー、ESTクローンのプラスミドDNAを鋳型、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、50℃15秒、72℃2分のサイクルを20回、続いて72℃7分の反応を行った。こうして生成した3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認し、pCRB-MDTS6-3Hとした。

配列番号2の1566番から1571番にBamHI認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS6TSP1-FLAGを制限酵素XbaI、BamHIで切断して生じた約1.6kbpのDNA断片と、pCRB-MDTS6-3HをBamHI、NotIで切断して生じた約1.3kbpのDNA断片を連結し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS6F-FLAGを完成した。

### 【 0 0 3 4 】

(実施例6) MDTS6TSP1の動物細胞株での発現

(実施例4)においてpCEP4dE2-FLAGを骨格として作製した発現プラスミドをF

uGENE<sup>TM</sup>6 Transfection Reagent (Boeringer Mannheim社製) を用いて添付指示書に従いHEK293-EBNA細胞 (invitrogen社製) に導入した。プラスミド導入後、1-2日間培養して得た培養上清中に目的蛋白が存在することを、C末端に付加したFLAGタグに対する抗体 (マウス抗FLAGモノクローナル抗体 (M2; Sigma社製) を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清をSDS/10%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社製) を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いてPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッケーズ (大日本製薬社製) を添加してブロッキングした後、マウス抗FLAGモノクローナル抗体 (M2; Sigma社製)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体 (Zymed社製もしくはTAGO社製) を順次反応させた。または、ブロッキング後、ビオチン化M2抗体 (Sigma社製)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Amasham社製) を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて該蛋白の発現を確認した (図1)。発現された蛋白の分子量はアミノ酸配列から算出される値よりも約23K小さかった。上述の如くHEK293-EBNA細胞にて発現させたMDTS6TSP1のN末端配列は、C末端にFLAGタグが付加していることを利用して、(実施例7-1)の方法でアフィニティ精製した後、PVDF膜に転写し、Ponceau S染色されたMDTS6TSP1のN末端配列をABI社494型ペプチドシーケンサーで解析することにより決定した。その結果、配列番号1の213番目のPheから始まっており、他のADAMTS分子同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にあるfurinプロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号1の213番から583番) になることが示唆された。また、MDTS6全長蛋白についても (実施例5) で得られた発現プラスミドを用い、上記MDTS6TSP1の蛋白発現と同様に得ることができ、MDTS6TSP1と同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にあるfurinプロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号1の213番から950番) になることが示された。

### 【 0 0 3 5 】

(実施例7) 動物細胞を宿主に発現したMDTS6TSP1蛋白の酵素活性の検出

(実施例7-1) 組換えアグリカンG1G2の調製

報告されているヒトアグリカンの遺伝子配列 (Doerge K, et al. Biochem Soc Trans., 18, 200-202, 1990) をもとに合成した配列番号11と配列番号12で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNAを鋳型、PyroBest<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを40回、続いて68℃7分の反応を行った。生成したDNA断片を制限酵素BamHIで切断し、pCEP-SigFlaのBamHI部位に導入し、ヒトアグリカンの球状ドメイン1 (G1) -球状ドメイン2 (G2) のN末にFLAGタグ、C末にHisタグの付加した蛋白を発現するために用いる発現プラスミドpCEP-rAggを作製した。pCEP-SigFlaはpCEP4dのHidIII、XhoI部位に配列番号13と配列番号14で示されるオリゴDNAの二重鎖を導入したものであり、プロモーターの下流に、文献 (Guan X-M. et al., J. Biol. Chem. 267, 21995-21998, 1992) に示されたインフルエンザウィルスのhemagglutinin由来の分泌シグナル配列とFLAGタグ配列、続いて、BamHI認識配列を有する発現ベクターである。

pCEP-rAggをHEK293-EBNA細胞に導入し、3-7日培養して目的蛋白を発現、生産した。培養液上清からの目的蛋白の精製は、N末端にFLAGタグが付加していることを利用して、アフィニティ精製した。すなわち、培養上清をカラムに詰めたM2-agarose (Sigma社製) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) / 150 mM NaCl (以下、TBSという) で洗浄した後、0.1M Gly-HCl (pH 3.0) で、溶出、分画し、直ちに1M Tris-HCl (pH 8.0) で中和した。

### 【 0 0 3 6 】

(実施例7-2) MDT56短長蛋白の組換えアグリカンG1G2分解活性の検出

(実施例6) において、発現プラスミド導入後12-16時間で培地を無血清に置換した後、さらに32-36時間培養を継続し、培養上清を回収した。この培養上清と上記で調製した組換えアグリカンを混合し、37℃で1夜反応させ、SDS-PAGE後、(実施例6) に記載した方法で、PVDF膜に転写、ブロッキング後、抗Hisx6ポリクローナル抗体 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology社製)、西洋わさびペーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体 (MBL社製) を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて組換えアグリカンを検出した。その結果、発現プラスミド

のみを導入したコントロールではみられない組換えアグリカンの分解物が検出された（図2）。

#### 【0037】

（実施例7-3）抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析

アグリカナーゼはアグリカンのGlu373-Ala374の間を選択的に切断する金属プロテアーゼである。この切断により生じたC側のネオエピトープを認識する抗体を常法に従い、Ala-Arg-Gly-Ser-Val-Val-Leu-Thr-Ala-Lys-Cysからなる合成ペプチドとKLHとのコンジュゲートをマウスに5回免疫を繰り返すことにより調製した。（実施例7-2）と同様に転写、ブロッキングしたPVDF膜とこの抗体を反応させ、続いて、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（Tago社製）と反応させた後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社製）を用いて検出した。その結果、MDTS6により生じた組換えアグリカンG1G2分解物が抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体と反応し、検出されたバンドの分子量は（実施例7-2）で検出された分解物の分子量と一致した（図3）。アグリカナーゼネオエピトープを認識するBC-3抗体（Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995）でも同じ結果が得られた。

#### 【0038】

（実施例8）IL-1によるMDTS6 mRNAの発現誘導

マウス細胞株ATDC5はインスリン処理により軟骨様細胞へと分化することが知られている（Atsumi T. et al., Cell Differ. Dev. 30,109-116, 1990）。I型コラーゲンコート6ウェルプレート（旭テクノグラス社製）にATDC5細胞を $4 \times 10^5$ /wellで蒔き、DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS培地で2日間培養した後、インスリン（終濃度30ng/ml）、50  $\mu$ g/ml L-アスコルビン酸含有DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS培地に交換し5日培養を継続し、IL-1 $\beta$ （終濃度5ng/ml）を添加して0、1、2、4、8時間処理した。各処理群よりISOGEN（日本ジーン社製）を用いてtotal RNAを調製し、その1  $\mu$ gを鋳型として、BcaBEST<sup>TM</sup> RNA PCR Kit（宝酒造社製）を用いRT-PCRを行った。逆転写反応は添付の指示書に従い、Oligo dT-Adaptor primerをプライマーとして行い、PCRはMDTS6の3' 非翻訳領域の配列を基に合成した配列番号15および配列番号16で示されるオリゴDNAをプライマーとして、94℃2分の後、94℃



30秒、60℃30秒、72℃30秒のサイクルを40回、続いて72℃7分の反応で行った。反応液を1%アガロースにて電気泳動し、生成した約0.3kbpのバンドの濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNAはIL-1により一過性に発現誘導されることが判明した（図4）。

### 【 0 0 3 9 】

（実施例9）MDTS6による天然型アグリカン分解

（実施例9-1）各種短長MDTS6蛋白の発現と組換えアグリカンG1G2分解活性

pCEP4dE2-FLAGを骨格として作製した発現プラスミドをFuGENE<sup>TM</sup>6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim社製) を用いて添付指示書に従いHEK293-EBNA細胞 (invitrogen社製) に導入した。プラスミド導入後、1夜培養後、PBS緩衝液で洗い、無血清培地に交換し、さらに2-3日間培養した。この培養液を9,000rpm、10分で遠心分離し、上清をMDTS6の酵素源とした。この際、（実施例4）および（実施例5）で示した発現プラスミド以外に、配列番号1の1番から447番のアミノ酸、配列番号1の1番から518番のアミノ酸、配列番号1の1番から685番のアミノ酸、配列番号1の1番から841番のアミノ酸、配列番号1の1番から896番のアミノ酸のC末にGly-Ser-Ala-Ala-Ala-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lysが付加した蛋白として発現するように発現プラスミドをデザインした。例えば、以降の実施例で用いる配列番号1の1番から685番のアミノ酸C末にGly-Ser-Ala-Ala-Ala-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lysが付加した蛋白（以降、MDTS6Cys）の発現プラスミドは、（実施例5）で構築した全長蛋白発現プラスミドを鋳型、配列番号7と配列番号17で示されるオリゴDNAをプライマーとして、PyroBest DNA polymeraseを用いたPCRにて増幅した遺伝子を制限酵素XbaI、NotIで切断しpCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して構築した。

上述の各種MDTS6蛋白のアグリカナーゼ活性を（実施例7-3）の方法で検討した結果、配列番号1の1番から447番のアミノ酸、配列番号1の1番から518番のアミノ酸からなる蛋白にはアグリカナーゼ活性が検出されなかった。すなわち、N末から数えて1個目のTSP-1繰り返し配列がMDTS6のアグリカナーゼ活性の発揮に必須であることが判明した。また、後者の2種および全長蛋白は培養上清中に放出される割合が低いことも判明した。

## 【 0 0 4 0 】

## (実施例9-2) 天然型アグリカンの分解

(実施例9-1) で調製したMDTS6酵素液90  $\mu$  lと天然型アグリカン (生化学工業社製) 10  $\mu$  g/10  $\mu$  l TBSを試験チューブ内で混合し、37℃で一夜反応させた。この反応産物をSpeedVacにて乾燥した後、Chondroitinase ABC 0.06単位 (生化学工業社製)、keratanase I 0.024単位 (生化学工業社製)、keratanase II 0.0004単位 (生化学工業社製)、5  $\mu$  M PMSF、10mM EDTAを含む10mM Tris-Acetate緩衝液(pH7.6) 100  $\mu$  lに溶解し、37℃で一夜反応させた。この反応液の一部をSDS-PAGE後、(実施例7-3) に示す通りにマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した。この際、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体はBiosource社製を用いた。アグリカナーゼネオエピトープを認識するBC-3抗体 (Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

その結果、MDTS6Cysでは約150KDaのバンドに加え、80-90Kdaのバンドが検出された。この切断パターンはヒトのOA、RAを含む関節疾患患者の関節滑液中に認められる主要な分子 (いずれもアグリカナーゼ分解で生じた) のパターン (Sandy J. D. et al, J. Clin. Invest., 89, 1512-1516, 1992; Lohmander L. S. et al., Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993) に一致し、また、ヒト膝関節軟骨の器官培養系においてIL-1、レチノイン酸処理12-24時間で生じる主要なアグリカナーゼネオエピトープを有する分子のパターン (Little C. B. et al., Biochemical J., 344, 61-68, 1999) に一致した (図5)。

## 【 0 0 4 1 】

## (実施例10) アグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング系

## (実施例10-1) MDTS6Cysおよび基質の調製

MDTS6Cysは精製せずとも (実施例9-1) の方法で調整した培養上清で上記組換えアグリカンG1G2および天然型アグリカンを "aggrecanase site" で切断することを、(実施例9-2) に示したウエスタンブロッティングを用いた方法で確認した。また、(実施例9-1) で無血清培地に置換せず、10%FBS含有培地で培養を継続した培養上清を用いても、"aggrecanase site" での切断が認められた。そのため、

基質としては（実施例7-1）で調製した組換えアグリカンG1G2を用いた。

#### 【 0 0 4 2 】

##### （実施例10-2）スクリーニング系

rAgg-G1-G2および天然型アグリカンを基質に（実施例7-2）に示したウエスタンブロッティングを用いた方法でスクリーニング可能であるが、より大量の被験化合物をスクリーニングするために下記のELISA系を構築した。

MDTS6Cys培養上清、組換えアグリカンG1G2、被験化合物を混合し、37℃にて数時間反応させた産物を96穴プレート（Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Plate MaxiSorp<sup>TM</sup> Surface #439454；Nunc社製）に吸着させ、1%BSA/TBS溶液でブロッキングした後、マウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いてHRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体（Biosource社製）を反応させ、TMB Peroxidase EIA Substrate Kit（Bio-Rad社製）で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。また、その変法として、rAggG1-G2を予め96穴プレート（同上）に吸着させ、1%BSA/TBS溶液でブロッキングした後、MDTS6Cys培養上清と被験化合物を添加し、37℃にて数時間反応させた後、同様にマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いてHRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体（Biosource社製）を反応させ、TMB Peroxidase EIA Substrate Kit（Bio-Rad社製）で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。本スクリーニング系により、PCT公開番号W090/5719に記載された化合物であるN- $\alpha$ -[3-(N-ヒドロキシカルバモイル)-2-イソブチル-3-メルカプトプロピオニル]-N- $\alpha$ -ジメチルチロシンアミド（化合物A）及びN- $\alpha$ -[3-(N-ヒドロキシカルバモイル)-2-イソブチル-4-メルカプトプロピオニル]-N-メチルフェニルアラニンアミド（化合物B）など選択することができた。

#### 【 0 0 4 3 】

##### （実施例11）

##### （実施例11-1）ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞の調製

ウサギ（日本白色種、オス、1.0～1.5kg）を過剰麻酔下で致死させた後、膝関節を摘出し、関節表面の軟骨層をメスにて剥離、細断した。さらに、トリプシン-EDTA（0.25%-1mM；GIBCO-BRL社製）にて37℃、1時間処理の後、1500rpm、5分の

遠心分離し沈殿をDMEMで洗浄した。続いてコラゲナーゼA (0.15% ; ベーリンガー・マンハイム社製) /DMEMにて37℃、3～4時間処理した後、ナイロンメッシュフィルター (100  $\mu$ m, Falcon社製) 通過画分を1500rpm、5分の遠心分離にかけ、軟骨細胞を沈殿させた。DMEM/10%FBS培地で十分に洗浄した後、DMEM/10%FBS培地に $2 \times 10^5$  cells/mlになるように懸濁し、I型コラーゲンをコートした96穴プレート (旭テクノグラス社製) に200  $\mu$ l/穴で蒔いた。3日後に培地を50  $\mu$ g/mlアスコルビン酸含有DMEM/10%FBS培地 (以下、アスコルビン酸培地) 200  $\mu$ lに交換し、さらに3日間培養した。I型コラーゲンをコートした6穴プレート (旭テクノグラス) を用いる場合は、上記細胞懸濁液を6ml/穴で蒔き、同様に培地交換を行い培養した。これらの細胞を以下の実験に供した。

## 【 0 0 4 4 】

## (実施例11-2) ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解

(実施例11-1) で示した96穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞を終濃度10  $\mu$  Ci/mlの $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 含有アスコルビン酸培地200  $\mu$ lにて2日間培養、標識した後、200  $\mu$ lのアスコルビン酸培地で3回洗浄し、200  $\mu$ lのアスコルビン酸培地で1日間培養した。IL-1 $\beta$  およびall-transレチノイン酸で刺激し、0時間後、24時間後、48時間後の培養上清を20  $\mu$ lずつ回収し、トップカウント (Packard社製) を用い、放射活性を計測した。その結果、0.01～10ng/mlのIL-1 $\beta$  で放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められ、0.1～10  $\mu$ Mのall-transレチノイン酸で濃度依存的かつ強い放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められた (図6)。

## 【 0 0 4 5 】

## (実施例11-3) MDTS6 mRNAの発現誘導

(実施例11-1) で示した6穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞をアスコルビン培地に交換しさらに3日間培養した後、10ng/mlのIL-1 $\beta$  もしくは10  $\mu$ Mのall-transレチノイン酸を添加し、2時間後および6時間後のtotal RNAをISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて添付の指示書に従い調製した。さらに、DNase I処理 (ニッポンジーン社製) を行い、フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿にて回収・精製したtotal RNAをDEPC処理した滅菌水に溶解した。ラン

ダムヘキサマーをプライマーとして、このtotal RNA 1 $\mu$ gをThermoscript<sup>TM</sup> RT-PCR System (GIBCO-BRL社製カタログ番号11146-016) を使い、添付の指示書に従い逆転写反応、RNase H処理を行ったものを滅菌水で10倍希釈し、cDNAサンプルとした。このcDNAサンプル各5 $\mu$ lを鋳型、配列番号18および配列番号19で示されるオリゴDNAをプライマーとして、94℃2分の後、94℃30秒、65℃30秒、72℃30秒のサイクルを45回、続いて72℃7分のPCR反応を行った。反応産物を2%アガロースにて電気泳動し、生成したDNA断片の濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNAはIL-1 $\beta$  およびall-transレチノイン酸により発現誘導し、その発現強度は（実施例11-2）におけるプロテオグリカン分解の程度と相関した（図7）。

## 【 0 0 4 6 】

（実施例12）アグリカナーゼ活性を阻害する物質によるウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解抑制

（実施例10-2）のスクリーニング系により選択された化合物Aおよび化合物Bを（実施例11-1）で示したウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解系に10 $\mu$ Mのall-transレチノイン酸刺激直前に添加し、その抑制作用を検討した。その結果、化合物Aおよび化合物Bは濃度依存的に抑制作用を示した（図8）。しかしながら、同じヒドロキサム酸骨格を持つアグリカナーゼ活性阻害が弱い化合物では100 $\mu$ Mでもプロテオグリカンの分解抑制作用は認められなかった。

## 【 0 0 4 7 】

（実施例13）MDTS-6プロモーター領域DNA配列の解析

MDTS6のプロモーター領域に相当するDNAはGenomeWalker DNA Sca I Libraries (genome walker<sup>TM</sup> Kits, CLONTECH社カタログ番号K1803-1)より、PCR法を用いて増幅した。forward primerとしてキット添付のアダプタープライマーAP-1(配列番号20)、AP-2(配列番号21)のオリゴDNAを、reverse primerとして配列番号22、配列番号23のオリゴDNAを用いた。具体的な方法はキットの添付説明書通りであるが、PCRにはTAKARA LA Taq (TAKARA LA Taq<sup>TM</sup>、カタログ番号RR002A)を用いた。1回目のPCR反応はプライマーとして配列番号20と配列番号22のオリゴDNAを用い、98℃5秒、72℃3分のサイクルを7回、98℃5秒、67℃3分のサイクルを32回

、67℃4分であった。2回目の反応は1回目の反応溶液をTE緩衝液(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)を用いて50倍希釈したものの5 $\mu$ lを鋳型、配列番号21と配列番号23のオリゴDNAをプライマーとして、上記と同じ条件で行った。増幅された約3.7 KbのDNA断片を直接dideoxy terminator法によりABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc)にて配列解析した結果、約2.2Kb, 0.36Kb, 0.8KbのDNA配列が明らかになった。

次に、PCR増幅DNA断片の直接解析で解読できなかった2カ所のギャップ部の配列を判読するために、このDNA断片をサブクローニングして、DNAの塩基配列の決定を行った。クローニングベクターとしてはpZER0<sup>TM</sup>-2 vector (Zero Background / Kan Cloning Kit, Invitrogen社製、カタログ番号K2600-01)を用いて、サブクローニングの操作は添付の説明書に従った。

上記DNA断片をレポータープラスミドpGV-B2 (東洋インキ社製) のKpnI、XhoI 部位に挿入したプラスミドをFuGene-6を用いHEK293細胞に導入し、通常の培養条件で28時間または48時間培養後のルシフェラーゼ活性を、PicaGene発色キット (東洋インキ社製、カタログ番号PGK-L100) を用いて測定した。この際、測定値は同時導入した $\beta$ -gal発現プラスミドpCH110 (アマシャムファルマシアバイオテック社製、カタログ番号27-4508-01) より発現した $\beta$ -galの活性値で補正した。 $\beta$ -gal活性の測定はGalacto-Light Plusキット (TROPIX社製、カタログ番号BL300P) を用いた。その結果、もとのプラスミドであるpGV-B2では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな上昇が観察された。このことは上記DNA断片中にプロモーター活性が存在することを示している。

#### 【 0 0 4 8 】

#### 【発明の効果】

本発明で得られた新規な金属プロテアーゼは、プロテアーゼ活性を有することより、医薬、及び医薬として用いられる該プロテアーゼの活性を有意に修飾する物質 (化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片) のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該プロテアーゼ及び該プロテアーゼの活性を有意に修飾する物質の医薬用途としては該新規蛋白活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患、例えば、癌、関節炎、変形性

関節症などが挙げられる。また、本発明の金属プロテアーゼは、アグリカナーゼ活性を有することより、該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ及び該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼを有意に修飾する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ及び該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼを有意に修飾する物質の医薬用途としては該新規蛋白活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患の内、特にプロテオグリカン分解を示す疾患である関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は実施例 6 で得られた、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 の動物細胞株での発現結果を示す写真である。

【図 2】 図 2 は実施例 7-2 で得られた、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出結果を示す写真である。

【図 3】 図 3 は実施例 7-3 で得られた、ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 で分解された組換えアグリカン G1G2 の抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析結果を示す写真である。

【図 4】 図 4 は実施例 8 で得られた、IL-1 $\beta$  による MDTS6 mRNA の発現誘導を検討した結果を示す電気泳動パターン写真である。

【図 5】 図 5 は実施例 9-2 で得られた、MDTS6 蛋白による天然型アグリカンの分解をウェスタンブロッティング検出システムを用い、抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した結果を示す写真である。

【図 6】 図 6 は実施例 11-2 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞からの all-trans レチノイン酸および IL-1 $\beta$  によるプロテオグリカンの遊離を検出した結果を示すグラフである。

【図 7】 図 7 は実施例 11-3 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞を all-trans レチノイン酸および IL-1 $\beta$  処理した場合の MDTS6 の遺伝子発現変動を RT-PCR 法により解析した結果を示す電気泳動パターン写真である。

【図 8】 図 8 は実施例 12 で得られた、all-trans レチノイン酸によるウサギ膝関節初代培養細胞からのプロテオグリカンの分解・遊離が化合物 A および化合物 B により抑制されることを示したグラフである。



【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> 新規なアグリカナーゼ

<130> WP32802941

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1

5

10

15

Gly Gly Phe Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp

20

25

30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35

40

45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50

55

60

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser

65

70

75

80



305	310	315	320
Leu Cys Gly Ala Thr	Thr Cys Asp Thr	Leu Gly Met Ala Asp	Val Gly
325	330	335	
Thr Met Cys Asp Pro	Lys Arg Ser Cys Ser	Val Ile Glu Asp	Asp Gly
340	345	350	
Leu Pro Ser Ala Phe	Thr Thr Ala His Glu	Leu Gly His Val	Phe Asn
355	360	365	
Met Pro His Asp Asn	Val Lys Val Cys Glu	Glu Val Phe Gly	Lys Leu
370	375	380	
Arg Ala Asn His Met	Met Ser Pro Thr	Leu Ile Gln Ile	Asp Arg Ala
385	390	395	400
Asn Pro Trp Ser Ala	Cys Ser Ala Ala	Ile Ile Thr Asp	Phe Leu Asp
405	410	415	
Ser Gly His Gly Asp	Cys Leu Leu Asp	Gln Pro Ser Lys	Pro Ile Ser
420	425	430	
Leu Pro Glu Asp Leu	Pro Gly Ala Ser	Tyr Thr Leu Ser	Gln Gln Cys
435	440	445	
Glu Leu Ala Phe Gly	Val Gly Ser Lys	Pro Cys Pro Tyr	Met Gln Tyr
450	455	460	
Cys Thr Lys Leu Trp	Cys Thr Gly Lys	Ala Lys Gly Gln	Met Val Cys
465	470	475	480
Gln Thr Arg His Phe	Pro Trp Ala Asp	Gly Thr Ser Cys	Gly Glu Gly
485	490	495	
Lys Leu Cys Leu Lys	Gly Ala Cys Val	Glu Arg His Asn	Leu Asn Lys
500	505	510	
His Arg Val Asp Gly	Ser Trp Ala Lys	Trp Asp Pro Tyr	Gly Pro Cys
515	520	525	
Ser Arg Thr Cys Gly	Gly Gly Val Gln	Leu Ala Arg Arg	Gln Cys Thr
530	535	540	

Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val			
545	550	555	560
Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly			
	565	570	575
Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His			
	580	585	590
Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser			
	595	600	605
Gly Val Ser Pro Arg Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly			
	610	615	620
Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu			
625	630	635	640
Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys			
	645	650	655
Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys			
	660	665	670
Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu			
	675	680	685
Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala			
	690	695	700
Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile			
705	710	715	720
Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu			
	725	730	735
Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val			
	740	745	750
Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser			
	755	760	765
Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu			

770	775	780
Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu		
785	790	795
Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg		800
	805	810
Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val		815
	820	825
Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp		830
	835	840
Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val		845
	850	855
Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala		860
865	870	875
Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr		880
	885	890
Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly		895
	900	905
Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu		910
	915	920
Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe		925
	930	935
Cys Val Leu Arg Pro Cys		940
945	950	

<210> 2

<211> 2853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

atgcttttgc tgggcatcct aaccctggct ttccgccgggc gaaccgctgg aggctctgag 60  
 ccagagcggg aggtagtcgt tcccatccga ctggaccgag acattaacgg ccgccgctac 120  
 tactggcggg gtcccagga ctccggggat cagggactca tttttcagat cacagcattt 180  
 caggaggact ttacctaca cctgacgccg gatgctcagt tcttggctcc cgccttctcc 240  
 actgagcatt tgggcgtccc cctccagggg ctaccgggg gctcttcaga cctgcgacgc 300  
 tgcttctatt ctggggacgt gaacgccgag ccggactcgt tcgctgctgt gagcctgtgc 360  
 ggggggctcc gcggagcctt tggctaccga ggccgccgagt atgtcattag cccgctgccc 420  
 aatgctagcg cgcggcgggc gcagcgcgaac agccagggcg cacaccttct ccagcgcggg 480  
 ggtgttccgg gcgggccttc cggagacccc acctctcgt gcgggggtggc ctccgggctgg 540  
 aaccccgcca tctacgggc cctggaccct tacaagccgc ggccggcggg ctccggggag 600  
 agtcgtagcc ggccgaggct tgggcgcgcc aagcgcttcg tgtctatccc gcgggtacgtg 660  
 gagacgctgg tggtcgcgga cgagtcaatg gtcaagtcc acggcgcgga cctggaacat 720  
 tatctgctga cgtctgtggc aacggcgggc cgactctacc gccatcccag catcctcaac 780  
 cccatcaaca tcgttgttgt caaggtgctg ctctttagag atcgtgactc cgggcccag 840  
 gtcaccggca atgcggccct gacgctgcgc aacttctgtg cctggcagaa gaagctgaac 900  
 aaagtgagtg acaagcacc caggtactgg gacactgcca tctcttcac caggcaggac 960  
 ctgtgtggag ccaccacctg tgacaccctg ggcatggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020  
 cccaagagaa gctgctctgt cattgaggac gatgggcttc catcagcctt caccactgcc 1080  
 cacgagctgg gccacgtgtt caacatgccc catgacaatg tgaaagtctg tgaggaggtg 1140  
 tttgggaagc tccgagccaa ccacatgatg tccccgacc tcatccagat cgaccgtgcc 1200  
 aacccttgt cagcctgcag tgctgccatc atcaccgact tcttgacag cgggcacggt 1260  
 gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc ccgaggatct gccggcgcc 1320  
 agctacacc tgagccagca gtgcgagctg gcttttggcg tgggctccaa gccctgtcct 1380  
 tacatgcagt actgcaccaa gctgtggtgc accgggaagg ccaagggaca gatggtgtgc 1440  
 cagaccgcc acttccccctg ggccgatggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500  
 aaaggggcct gcgtggagag acacaacctc aacaagcaca ggggtgatgg ttcttgggcc 1560  
 aaatgggatc cctatggccc ctgctcgcgc acatgtggtg ggggcgtgca gctggccagg 1620  
 aggcagtgca ccaacccac ccctgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgagggtg 1680

aaataccgat cctgcaacct ggagccctgc cccagctcag cctccggaaa gagcttccgg 1740  
 gaggagcagt gtgaggcttt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctcgcc 1800  
 gtggcatggg tgcccaagta ctccggcgtg tctccccggg acaagtgcaa gctcatctgc 1860  
 cgagccaatg gcactggcta ctctatgtg ctggcaccca aggtgggtga cggcacgctg 1920  
 tgctctcctg actccacctc cgctctgtgc caaggcaagt gcatcaaggc tggctgtgat 1980  
 gggaacctgg gctccaagaa gagattcgac aagtgtgggg tigtgtgggg agacaataag 2040  
 agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagcccatgc atggctacaa ttctgtggtg 2100  
 gccatccccg caggcgcctc aagcatcgac atccgccagc gcggttacia agggctgata 2160  
 ggggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgct caacgggcat 2220  
 ttctgtggtg cggcgggtga gcgggacctg gtggtgaagg gcagctgct gcggtacagc 2280  
 ggcacgggca cagcgggtga gagcctgcag gcttccccgc ccatcctgga gccgctgacc 2340  
 gtggaggctc tctccgtggg gaagatgaca ccgccccggg tccgctactc ctctatctg 2400  
 cccaaagagc ctccggagga caagtcctct catccaagg acccccgggg accctctgtc 2460  
 ttgcacaaca gcgtcctcag cctctccaac cagggtggagc agccggacga caggccccct 2520  
 gcacgctggg tggctggcag ctgggggccc tgctccgcga gctgcggcag tggcctgcag 2580  
 aagcgggcgg tggactgccg gggctccgcc gggcagcgca cggctccctgc ctgtgatgca 2640  
 gcccatcggc ccgtggagac acaagcctgc ggggagccct gcccacactg ggagctcagc 2700  
 gcctggtcac cctgctccaa gagctgcggc cggggatttc agaggcgctc actcaagtgt 2760  
 gtgggccacg gaggccggct gctggcccgg gaccagtgca acttgcaccg caagccccag 2820  
 gagctggact tctgcgtcct gaggccgtgc tga 2853

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa 50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc 34

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ggactagtgt cgaccgggtca tggctgcgc 29

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 7

gtgtctagag ccatgctttt gctgggcata ctaaccctgg ct

42

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

agagcggccg cctgctcctc ccggaagctc ttcccgagg c

41

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aagcacaggg tggatggttc ctgggcc

27

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag

37

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

taggatcctt gtagaaactt cagaccatga caactcg 37

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggatcctc aatggtgatg gtgatgatga ccgaagcaga aggcattggtg ccgggacag 59

<210> 13

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

agcttgccac catgaagacg atcatcgccc tgagctacat cttctgcctg gtattcgccg 60  
actacaagga cgatgatgac aaggggatcc actagtc 97

<210> 14

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tcgagactag tggatcccct tgtcatcatc gtcctttag tcggcgaata ccaggcagaa 60  
gatgtagctc agggcgatga tcgtcttcat ggtggca 97

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

acctcagcag ccagctccct tgtatacaca 30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

cttgaggggg atggaccaat acagctttgg 30

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

agagcggccg ctccagtcac cttcttcgag ctcttatt 38

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcggacgagt ccatgggtcaa gttccac

27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ttctgccagg cgcagaagtt gcgcagc

27

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

actatagggc acgcgtggt

19

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

actgagcatc cggcgtcagg ttaggtaaa

30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

agtcctcctg aaatgctgtg atctgaaaaa

30

<210> 24

<211> 3473

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 24

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60

tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatattt gacctgggtcg 120

ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
 gtggagtgcc aatcctgagt atcaccicta ctcaagtgc caacatatcc ctagatccctc 300  
 aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatggt tagcacatac taagcctgca 420  
 atacatgcta atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
 tagctgggct gtgattgggg caggggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
 ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctigccaaaa cccatgggtc agaataaag 600  
 taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
 tgcttgcccc aaataaatga ctatcattg ctgttggttg tctgcgttcc tctttaatta 720  
 taggccctct ttgaacgtc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780  
 cacacagtc tcccatatcc atacactctc ttctatttgc agagtataaa caccatctc 840  
 tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtcca atcaaggaga ggcctcactg 900  
 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
 ggatccctta tggggagaag ataattggga aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020  
 agccttttct ctctttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
 attccaaaat tctcccatc catcccttt atgttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
 tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga tttctaggt 1200  
 atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
 aagttgattc tgcggagagg taagaaggat ctgaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
 ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
 cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440  
 ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500  
 tgtaactgca gccccagaa ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
 gggctcatct tctgcccc aacccagct ctgatttgc tattcaggtg gtgtaaatac 1620  
 ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
 acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
 tgtctcagag ggttggcgt tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
 gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860

tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
 gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat tggcctagcg 2040  
 tgggtgtcgtg tgtctgtggt cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca 2100  
 aggtaggagg atcacccgag gtcggtagt ttgcagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc 2160  
 ctgtctttac taaaaataca aaattagctg ggcggtgggtg tgcatgcctg taattccagc 2220  
 tacttgggag gctgagacag gagaatggct tgaaccggga aggcggagtt tgcggtgagc 2280  
 tgagatcgcg tcatgtcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa 2340  
 aagaaatata tataatatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtatgtata tatatatatg 2400  
 tatgtgtata tatatgtatg tgtgtgtgtg tgcatatata tatatacact ttgtttaatt 2460  
 gtaagtgtgt ttagtttaatt ttttaataat gtccgtgatt aacagctggc tggcaagatt 2520  
 cctgagaact gaagagtttg cccagccca tccagcacac catgggcca gggcagacct 2580  
 tggggctagg cggcttggg ttccagaggg cccccatgcc cctgtcctat tgctcttctg 2640  
 gcaataggac atttacgcgg gggggggggg tggttcttga ttctgggtct tttaggggac 2700  
 tctgtgatta agaaacagca gggatgttgc aacagcaggg atgaggtggg cctggggacg 2760  
 ggctcagtga gggcttcat tccatgctgc tgacctgatc tgccctgaga taaaagacta 2820  
 agaccagag agtgaacgct gtccgcgggg gcagaagcga gtgaggcgtc gggacagtgg 2880  
 ggcataacca agagcaaaac gcaaaactgag acttcagcgc cggtttctcg ggccagccca 2940  
 cgcctcctgc ctgagctcaa tgccactccc tccccgcaa gtggctctcc gctctggagg 3000  
 cgggaccgag ttctccggtg gcccctggag gctccggcag cgagctctgg gaggtggga 3060  
 ggggagttag gggaggggcg ctgactgggc cgtccaaaga ggagggggcc tttaataggc 3120  
 tcgcccagcg cctggcttgc tgcgtgcga gtggctgcgg ttgcgagaag ccgcccggca 3180  
 ccttccgcta gttctcggt gcaaactctt gtccttgac ttgacagcga ttgtacttaa 3240  
 gctcccaggg cgcgctttgc ttggaaggc acaggtagga agcgcgggct gccgggtgca 3300  
 cgctcgccgc cctgggagga gtctccctcc cttggctctc ctttctggga actgccggt 3360  
 gtcccgtagc gttggcggtt ccagagtgcg ggctgcacgg agaccgcggc agcggccgga 3420  
 gagcccgcc cagcccttc ccacagcgcg gcggtgcgt gcccggcgcc atg 3473

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 25

```

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttcctt ccataggcct caatcagtc tgtaatat tt gacctggtcg 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccttctt cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300
aatccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaattcac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg caggggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaataaaag 600
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780
cacacagtc tcccatacc atacactctc ttctatttgc agagtataaa cacccatctc 840
tcactcattc acataatgaa ttctagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccttta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctcccatc catcccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200

```



atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccctgcct tctcccttg tcagagaaag 1260  
 aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
 ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
 cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440  
 ttcattggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500  
 tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
 gggctcatct tctgcccc aaccccagct ctgatttgct tattcaggtg gtgtaaatac 1620  
 ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
 acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactctttt tgggagttgc 1740  
 tgtctcagag ggttggcggc tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
 gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
 tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
 gatttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaa atacacacac 1980  
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac aaattggcct agcgtgggtg 2040  
 cgtgtgtctg tggctgcagt tactcaggag accaaggtag gaggtaggaa accaaggtag 2100  
 gaggatcacc cgaggtcggt agtctgagac cagcctgacc aacatggaga aaccctgtct 2160  
 ttactaaaaa tacaaaatta gctgggcgtg gtggtgcatg cctgtaattc cagctacttg 2220  
 ggaggctgag acaggagaat ggcttgaacc cggaaggcgg agtttgcggt gagctgagat 2280  
 cgcgtcattg cactccagcc tgggcaacaa gagcaaaact ccgtctcaa aaaaaagaaa 2340  
 tatatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400  
 tatatatatg tatgtgtgtg tgtgtgcata tatatatata cactttgttt aattgtaagt 2460  
 gtgtttagtt taatttttaa taatgtccgt gattaacagc tggctggcaa gattcctgag 2520  
 aactgaagag tttgccccag cccatccagc acaccatggg cccagggcag accttggggc 2580  
 taggcggtct tgggttccag agggctccca tgcccctgtc ctattgctct tctggcaata 2640  
 ggacatttac gcgggggggg ggggtggtt ttgattctgg gtccttttagg ggactctgtg 2700  
 attaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tgggcctggg gacgggtcag 2760  
 tgaagggtct tcatttctag ctgctgacct gatctgccct gagataaaag actaagaccc 2820  
 agagagtga cgctgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880  
 accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcgccggttt ctggggccag cccacgcctc 2940

ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgctctg gaggcgggac 3000  
cgagttctcc ggtggcccct ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060  
tgaggggagg ggcgctgact gggccgtcca aagaggaggg ggcctttaat aggctcgccc 3120  
agcgcctggc ttgctgcgct gcgagtggct gcggttgca gaagccgccc ggcaccttcc 3180  
gctagttctc ggctgcaaat cticgtcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240  
agggcgcgct ttgcttgaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctgccggg tgcacgctcg 3300  
ccgccctggg aggagtctcc ctcccttggc tctcctttct gggaactgcc ggctgtcccg 3360  
tagcgttggc ggttccagag tgcgggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420  
ggcccagccc ctccccacag cgcggcgggtg cgctgcccg cgccatg 3467

<210> 26

<211> 3464

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 26

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatat t gacctggtcg 120  
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat aacccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
gtggagtgcc aatctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctatgcctc 300  
aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atccctttga gcaaattcac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540

ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600  
 taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
 tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720  
 taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780  
 cacacagtcc tcccatacce atacactctc tticatttgc agagtataaa caccatctc 840  
 tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
 ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgcct ttcactgatg gaccagtccc 1020  
 agccttttct ctccctggac aatagagtcc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaaa 1080  
 attccaaaat tctcccatcat catccctttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
 tgctctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga tttcttaggt 1200  
 atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccctgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
 aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttgaggctt agagcctgaa aaactccttg 1320  
 ggctgtttct caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
 cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440  
 ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctctt 1500  
 tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
 gggctcatct tcttgcccc aacccagct ctgatttgct tattcagggtg gtgtaaatac 1620  
 ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
 acaccattta atatttcct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
 tgtctcagag ggttggcggc tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
 gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
 tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
 gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtggtgtcg 2040  
 tgtgtctgtg gtcgcagtta ctcaggagac caaggtagga ggtaggaaac caaggtagga 2100  
 ggatcaccgg aggtcggttag ttcgagacca gcctgaccaa catggagaaa cctgtcttt 2160  
 actaaaaata caaaattagc tgggcgtggc ggtgcatgcc tgtaattcca gctacttggg 2220  
 aggctgagac aggagaatgg cttgaaccgg gaaggcggag tttgcggtga gctgagatcg 2280

cgtcattgca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaaactcc gtctcaaaaa aaaagaaata 2340  
 tatatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400  
 tatatatatg tatgtgtgtg tgtgtgcata tatatataca ctttgtttta ttgtaagtgt 2460  
 gtttagittta atttttaata atgtccgiga ttaacagctg gctggcaaga ttcctgagaa 2520  
 ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac cttggggcta 2580  
 ggcggtcttg gggtccagag ggctcccatg cccctgtcct attgctcttc tggcaatagg 2640  
 acatttacgc gggggggggg gtgggtcttg attctgggtc ttttagggga ctctgtgatt 2700  
 aagaaacagc agggatgttg caacagcagg gatgagggtg gcctggggac gggtcagtga 2760  
 agggctctca ttcctagctg ctgacctgat ctgccctgag ataaaagact aagaccaga 2820  
 gagtgaacgc tgtccgcggg ggcagaagcg agtgaggcgt cgggacagtg gggcataacc 2880  
 aagagcaaaa cgcaaaactga gacttcagcg ccggtttctc gggccagccc acgcctcctg 2940  
 cctcagctca atgccactcc ctccccgcca agtggctctc cgctctggag gcgggaccga 3000  
 gttctccggt ggccccctgga ggctccggca gcgagctctg ggaggctggg aggggagtga 3060  
 ggggaggggc gctgactggg ccgtccaaag aggagggggc ctttaatagg ctgcccagc 3120  
 gcctggcttg ctgcgctgcg agtggctgcg gttgcgagaa gccgcccggc acctccgct 3180  
 agttctcggc tgcaaatctt cgtccttgca cttgacagcg attgtactta agctcccagg 3240  
 gcgcgctttg cttggaaagg cacaggtagg aagcgcgggc tgccgggtgc acgctcgccg 3300  
 ccctgggagg agtctccctc ctttggtctt ctttctggg aactgccggc tgtcccgtag 3360  
 cgttggcggt tccagagtgc gggctgcacg gagaccgcgg cagcggccgg agagcccggc 3420  
 ccagcccctt cccacagcgc ggcggtgcgc tgcccggcgc catg 3464

<210> 27

<211> 3469

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

&lt;400&gt; 27

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctg 120  
 ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
 gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgtc caacatatcc ctagatcctc 300  
 aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
 atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
 tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
 ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaataaaag 600  
 taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
 tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgttcc tctttaatta 720  
 taggcctctt ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780  
 cacacagtcc tcccatatcc atacactctc ttctatttgc agagtataaa caccatctc 840  
 tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
 ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020  
 agccttttct ctccctggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
 attccaaaat tctcccatat catccctttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
 tgcctcctcc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
 atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccctgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
 aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagagttc agagcctgaa aaactccttg 1320  
 ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
 cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttggt caagggtcaa atgagataat 1440  
 ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttcctct 1500  
 tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
 gggctcatct tccgtccccc aacccagct ctgatttgct tattcaggtg gtgtaaatac 1620

ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
 acaccattta atatttccct cacatttcca cccatttctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
 tgctcagag ggttggcggg tctgggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
 gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcattg 1860  
 tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
 gatttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc ctagcgtggt 2040  
 gtcgtgtgtc tgtggtcgca gttactcagg agaccaaggt aggaggtagg aaaccaaggt 2100  
 aggaggatca cccgaggtcg gtagttcgag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160  
 ctttactaaa aatacaaaat tagctgggcg tgggtgtgca tgcctgtaat tccagctact 2220  
 tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc ggagtttgcg gtgagctgag 2280  
 atcgcgatcat tgcactccag cctgggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaga 2340  
 aatatatata tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtatatata tatatgtatg 2400  
 tgtatatata tgtatgtgtg tgtgtgtgca tatatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460  
 gtgtgttttag ttaattttt aataatgtcc gtgattaaac gctggctggc aagattcctg 2520  
 agaactgaag agtttgcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agacctggg 2580  
 gctaggcggg cttgggttcc agagggtccc catgcccctg tcctattgct ctictggcaa 2640  
 taggacattt acgcgggggg ggggggtggt tcttgattct gggtctttta ggggactctg 2700  
 tgattaagaa acagcaggga tgttgcaaca gcaggatga ggtgggcctg gggacgggtc 2760  
 agtgaagggt cttcattcct agctgctgac ctgatctgcc ctgagataaa agactaagac 2820  
 ccagagagtg aacgctgtcc gcgggggcag aagcgagtga ggctcggga cagtggggca 2880  
 taaccaagag caaaacgcaa actgagactt cagcgccggt ttctcgggcc agcccacgcc 2940  
 tcctgcctca gctcaatgcc actccctccc cgccaagtgg ctctccgctc tggaggcggg 3000  
 accgagttct ccggtggccc ctggaggctc cggcagcgag ctctgggagg ctgggagggg 3060  
 agtgagggga ggggcgctga ctgggccgtc caaagaggag ggggccttta ataggctcgc 3120  
 ccagcgctg gcttgctgcg ctgcgagtgg ctgcggttgc gagaagccgc ccggcacctt 3180  
 ccgctagttc tcggctgcaa atcttcgtcc ttgcacttga cagcgattgt acttaagctc 3240  
 ccagggcgcg ctttgcttgg aaaggcacag gtaggaagcg cgggctgccg ggtgcacgct 3300  
 cgccgccctg ggaggagtct ccctcccttg gctctcctt ctgggaactg ccggtgttcc 3360

cgtagcggttg gcggttccag agtgcgggct gcacggagac cgcggcagcg gccggagagc 3420  
ccggcccagc cccttcccac agcgcggcgg tgcgctgccc ggcgccatg 3469

<210> 28

<211> 3470

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 28

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatTT gacctggctc 120  
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat accccttctc ttttgacaga cgagtcagag aatcagatca gtgatagaag 240  
tggagtgcc aacctgagta tcacctctac tcaagtgtc aacatatccc tagatcctca 300  
attccctggc aaaagtgatt ggatggaacc acaggcttcc aagaggggac agtcaagcat 360  
taaatacgag aatgcacata taactcttgg tgcaatgttt agcacatact aagcctgcaa 420  
tacatgctaa tccctttgag caaatccaca tggccagttt ctgtgctcag gggtgagaat 480  
agctgggctg tgattggggc agggggagca ctaagtggga gggacttct gtctcaggtc 540  
cctgccatct tgactgacat gctgcagccc ttgccaaaac ccatgggtca gaatgaaagt 600  
aaagtgccgt tgaaaacctt gcaatccacc tttaaaactg ccgggtgtag taaaacaatt 660  
gcttgcccca aataaatgac ttatcattgc tgttggttgt ctgcgtttct ctttaattat 720  
aggccctctt tgaacgtca aacacacagg gcctttgtaa gcttgaactc cctgtctcac 780  
acacagtctt ccataccca tacactctct ttcatttgca gagtataaac acccatctct 840  
cactcattca cataatgaat ttcagctctt tgtgtcccaa tcaaggagag gcctcactgg 900  
aattatgggc atctgagcca tcttcatgtt ccaaggcccc agggggcgct tccaagagt 960

gatcctttat ggggagaaga taatgggcaa aaagtgcctc tcactgatgg accagtccca 1020  
gccttttctc tccttggaca atagagttct tcccttgaac agccacttcc ctaaaaaaaaa 1080  
ttccaaaatt cccccacatc atccccctta tgcttaaaat catcacacac tcccttcttt 1140  
gtcctccctt ctgcaaaact caactcagag cccttggct ccagaaagat ttcttaggta 1200  
tcaggagaga gtagcaaagc ctccctctc tccttgcctt tctcccttgt cagagaaaga 1260  
agttgattct gcggagaggt aagaaggatc ttgaggctta gagcctgaaa aactccttgg 1320  
gctgttctcc aaactagatg ggaacataag gtgcgattgc atcttctcca gctgatactc 1380  
actcggcctc ctatgccagt cccagttcca gggttggctc aagggtcaaa tgagataatt 1440  
tcatggagga agcctggccc gatcttctta ctgttgcctg gaagacagcc tcttctctt 1500  
gtaactgcag cccagaacc tgatctccac atccctgcca ggcaggtagc tgtgtacaag 1560  
ggctcatctt cctgccccca acccagctc tgatttgcct attcaggtgg tgtaaatact 1620  
tctaccagga cctatttcaa gccatttga tgtccctgac tggggagatg cagggcagca 1680  
caccatttaa tatttccctc acatttccac cccattctgc actcttttct gggagttgct 1740  
gtctcagagg gttggcgggt ctggtggctc aagaccataa gtaattatca aatacttagg 1800  
aagcgacggg ttttgagtat ttattacctt ttaaaaatgt actttgtggc taggcatggt 1860  
ggctcacgcc tgtagtcccc gcaccgggag gccgaggtgg gtggattgct tgagctcagg 1920  
agttcaagac cagcctgggc aacacggcga aaccagctc ctaccaaaaa tacacacaca 1980  
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca caaattggcc tagcgtgggtg 2040  
tcgtgtgtct gtggtcgcag ttactcagga gaccaaggta ggaggtagga aaccaaggta 2100  
ggaggatcac ccgaggtcgg tagttcgaga ccagcctgac caacatggag aaaccctgtc 2160  
tttactaaaa atacaaaatt agctgggcgt ggtggtgcat gcctgtaatt ccagctactt 2220  
gggaggctga gacaggagaa tggcttgaac ccggaaggcg gagtttgcgg tgagctgaga 2280  
tcgcgtcatt gcactccagc ctgggcaaca agagcaaaac tccgtctcaa aaaaaagaa 2340  
atatatatat atatgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat gtatatatat atatgtatgt 2400  
gtatatatat gtatgtgtgt gtgtgtgcat atatatatat acactttgtt taattgtaag 2460  
tgtgtttagt ttaattttta ataatgtccg tgattaacag ctggctggca agattcctga 2520  
gaactgaaga gtttggccca gcccatccag cacaccatgg gccagggca gaccttgggg 2580  
ctaggcggtc ttgggttcca gagggctccc atgcccctgt cctattgctc ttctggcaat 2640  
aggacattta cgcggggggg gggggggtgg ttcttgattc tgggtctttt aggggactct 2700



gtgattaaga aacagcaggg atgttgcaac agcagggatg aggtgggcct ggggacgggt 2760  
 cagtgaaggg tcttcattcc tagctgctga cctgatctgc cctgagataa aagactaaga 2820  
 cccagagagt gaacgctgtc cgcgggggca gaagcgagtg aggcgtcggg acagtggggc 2880  
 ataaccaaga gcaaaacgca aactgagact tcagcgccgg tttctcgggc cagcccacgc 2940  
 ctctgcctc agctcaatgc cactccctcc ccgccaagtg gctctccgct ctggaggcgg 3000  
 gaccgagttc tccggtggcc cctggaggct ccggcagcga gctctgggag gctgggaggg 3060  
 gagtgagggg aggggcgctg actgggccgt ccaaagagga gggggccttt aataggctcg 3120  
 cccagcgctt ggcttgctgc gctgcgagtg gctgcggttg cgagaagccg cccggcacct 3180  
 tccgctagtt ctcggtgca aatcttcgtc ctgacattg acagcgattg tacttaagct 3240  
 cccagggcgc gctttgcttg gaaaggcaca ggtaggaagc gcgggctgcc gggtgcacgc 3300  
 tcgccgccct gggaggagtc tccctccctt ggctctcctt tctgggaact gccggctgtc 3360  
 ccgtagcgtt ggcggttcca gagtgcgggc tgcacggaga ccgcggcagc ggccggagag 3420  
 cccggcccag ccccttccca cagcgcggcg gtgcgctgcc cggcgccatg 3470

<210> 29

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 29

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
 tcaactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatTTT gacctggctg 120  
 ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
 gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300

aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
tagctgggct gtgattgggg caggggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctigccaaaa cccatgggtc agaatagaaag 600  
taaagtgcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720  
taggccctct ttgaacgtc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780  
cacacagtcc tcccatacc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattc acataatgaa tttcagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttcactgatg gaccagtccc 1020  
agccttttct ctccctggac aatagagttc ttccttgaa cagccacttc cctaaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctcccacat catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctct ctccctgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500  
tgtaactgca gcccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tctgcccc aaccccagct ctgatttgct tattcaggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccatttg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc ctagcgtggt 2040

gtcgtgtgtc tgtggtcgca gttactcagg agaccaaggt aggaggtagg aaaccaaggt 2100  
 aggaggatca cccgaggctg gtagttcgag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160  
 ctttactaaa aatacaaaat tagctgggcg tgggtgtgca tgcctgtaat tccagctact 2220  
 tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc ggagtttgcg gtgagctgag 2280  
 atcgcgatcat tgcactccag cctgggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaga 2340  
 aatatatata tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtatata tatatatgta 2400  
 tgtgtatata tatgtatgtg tgtgtgtgtg catatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460  
 gtgtgttttag ttttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg 2520  
 agaactgaag agtttgcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccctggg 2580  
 gctaggcggt cttgggttcc agagggtcc catgcccctg tcctattgct cttctggcaa 2640  
 taggacattt acgcgggggg ggggtggttc ttgattctgg gtcttttagg ggactctgtg 2700  
 attaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tgggcctggg gacgggtcag 2760  
 tgaagggtct tcattcctag ctgctgacct gatctgccct gagataaaag actaagaccc 2820  
 agagagtga cgtgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880  
 accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcgccggtt ctcgggccag cccacgcctc 2940  
 ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgctctg gaggcgggac 3000  
 cgagtctcc ggtggcccct ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060  
 tgaggggagg ggcgctgact gggccgtcca aagaggaggg ggcctttaat aggctcgccc 3120  
 agcgccctggc ttgctgcgct gcgagtggct gcggttgca gaagccgccc ggcaccttcc 3180  
 gctagtctc ggctgcaa atcttcgtcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240  
 agggcgcgct ttgcttgaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctgccggg tgcacgctcg 3300  
 ccgccctggg aggagtctcc ctcccttggc tctcctttct gggaactgcc ggctgtcccg 3360  
 tagcgttggc ggttccagag tgcgggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420  
 ggcccagccc ctccacag cgcggcggtg cgctgcccgg cgccatg 3467

<210> 30

<211> 3462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 30

```

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatTT gacctggtcg 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300
aatccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatggt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaatecac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg caggggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctgtccaaaa cccatgggtc agaataaaag 600
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatecac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780
cacacagtcc tcccatatcc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa tttcagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatcccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctctttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc ctaaaaaaaaa 1080
attccaaaat tctcccatat catccctttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctctttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380

```

cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggt caagggtcaa atgagataat 1440  
 ttcattggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttcctct 1500  
 tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
 gggctcatct tccctgcccc aacccagct ctgatttgct tattcagggtg gtgtaaatac 1620  
 ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
 acaccattta atatttcctt cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
 tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
 gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcattg 1860  
 tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920  
 gattcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980  
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtggtgtcg 2040  
 tgtgtctgtg gtcgcagtta ctccaggagac caaggtagga ggtaggaaac caaggtagga 2100  
 ggatcacccg aggtcggtag ttccagacca gcctgaccaa catggagaaa ccctgtcttt 2160  
 actaaaaata caaaattagc tgggcgttgt ggtgcatgcc tgtaattcca gctacttggg 2220  
 aggtgagac aggagaatgg ctgaacccg gaaggcggag ttgctgggtg gctgagatcg 2280  
 cgicattgca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtctcaaaaa aaaagaaata 2340  
 tatatatata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtatgta tatatatata tgtatgtgta 2400  
 tatatatgta tgtgtgtgtg tgtgcatata tatatatata ctttgtttta ttgtaagtgt 2460  
 gtttagttta atttttaata atgtccctga ttaacagctg gctggcaaga ttctgagaa 2520  
 ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac cttggggcta 2580  
 ggcggtcttg ggttccagag ggctcccatg cccctgtcct attgtctctc tggcaatagg 2640  
 acatttacgc gggggggggg ggttcttgat tctgggtctt ttaggggact ctgtgattaa 2700  
 gaaacagcag ggatgttgca acagcaggga tgagggtggc ctggggacgg gtcagtgaag 2760  
 ggtcttcatt cctagctgct gacctgatct gccctgagat aaaagactaa gaccagaga 2820  
 gtgaacgctg tccgcggggg cagaagcgag tgaggcgtcg ggacagtggg gcataaccaa 2880  
 gagcaaacg caaactgaga ctccagcgcc ggtttctcgg gccagcccac gcctcctgcc 2940  
 tcagctcaat gccactccct ccccgccaag tggctctccg ctctggaggc gggaccgagt 3000  
 tctccggtgg cccctggagg ctccggcagc gagctctggg aggtctgggag gggagtggg 3060  
 ggaggggcgc tgactgggcc gtccaaagag gagggggcct ttaataggct cggccagcgc 3120

ctggcttgct gcgctgcgag tggctgcggt tgcgagaagc cgcccggcac cttccgctag 3180  
 ttctcggctg caaatcttcg tccttgcact tgacagcgat tgtacttaag ctcccagggc 3240  
 gcgctttgct tggaaaggca caggtaggaa gcgcgggctg ccgggtgcac gctcgccgcc 3300  
 ctgggaggag tctccctccc ttggctctcc tttctgggaa ctgccggctg tcccgtagcg 3360  
 ttggcggttc cagagtgcgg gctgcacgga gaccgcggca gcggccggag agcccggccc 3420  
 agcccccttc cacagcgcg cggtgcgctg cccggcgcca tg 3462

<210> 31

<211> 3455

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 31

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctg 120  
 ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
 gagctaggat aacccttctt cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
 gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctagatcctc 300  
 aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
 atacatgcta atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
 tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
 ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaataaaag 600  
 taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
 tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtt tctgcgtttc tctttaatta 720

特2000-144020

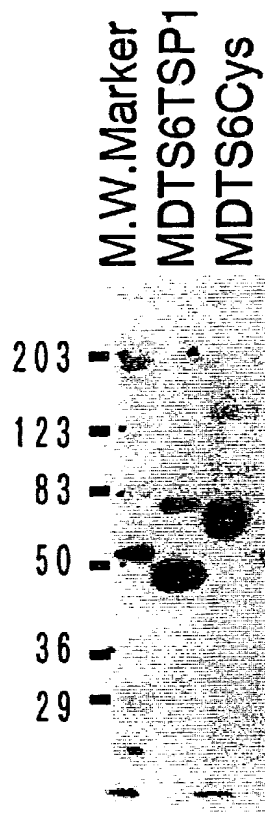
taggcccctct tgaacgctc aaacacacag ggcccttgta agcttgaact cccgtctca 780  
cacacagicc tcccatacc atacactctc tticatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggccctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatcccttta tggggagaag ataattggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020  
agccctttct ctccttggac aatagattc ttcccttgaa cagccattc cctaaaaaa 1080  
attccaaaat tctccacat catcccttt atgcctaaaa tcatcacaca ctccttctt 1140  
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gcccttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaag cctccctct ctccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tcccagtcc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgttttct acgttttgc ggaagacagc ccttctctt 1500  
tgtaactgca gcccagaac ctgatttcca catecttgc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggtctatct tctgtcccc aacccagct ctgatttgc tttcaggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctattica agccatttg atgtccctga cactctttc tgggattgc 1680  
acaccattia atatttccct cacatttcca cccatttgc cactctttc tgggattgc 1740  
tgtctcagag ggttggcgt tctgttggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtg ctaggcatg 1860  
tggttcacgc ctgtatccc cgcaccggga ggccgagggt ggttgattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac aggtaggagg taggaaacca aggtaggagg 2040  
tgtctgtggt cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca aggtaggagg 2100  
atcacccgag gtcggtagt cagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc ctgtctttac 2160  
taaaaataca aaattagctg ggcgtgttgg tgcctgctg taattccagc tacttggag 2220  
gcigagacag gagaatggct tgaaccggga aggcggagt tgcgtgagc tgagatcgcg 2280  
tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaactccgt ctcaaaaaa aaaaaatata 2340  
tatatatgtg tgtgtgtgtg tatgtatata tatatatgta tgtgtatata 2400  
tatgtatgtg tgtgtgtgca tatatatata tacatttgt ttaattgtaa gtgtgtttag 2460

tttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg agaactgaag 2520  
 agtttgcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccttggg gctaggcggt 2580  
 ctgggttccc agagggtccc catgcccctg tcctatigct cttctggcaa taggacattt 2640  
 acgcgggggg ggtggttctt gattctgggt cttttagggg actctgtgat taagaaacag 2700  
 cagggatgtt gcaacagcag ggatgagggt ggccctgggga cgggtcagtg aagggtcttc 2760  
 attcctagct gctgacctga tctgccctga gataaaagac taagaccag agagtgaacg 2820  
 ctgtccgcgg gggcagaagc gagtgaggcg tcgggacagt ggggcataac caagagcaaa 2880  
 acgcaaactg agacttcagc gccggtttct cgggccagcc cacgcctcct gcctcagctc 2940  
 aatgccactc cctccccgcc aagtggctct cgcctctgga ggcgggaccg agttctccgg 3000  
 tggcccctgg aggctccggc agcgagctct gggaggctgg gaggggagtg aggggagggg 3060  
 cgctgactgg gccgtccaaa gaggaggggg ccittaatag gctcgcccag cgcctggctt 3120  
 gctgcgctgc gagtggctgc ggttgcgaga agccgcccgg caccttcgc tagttctcgg 3180  
 ctgcaaactt tcgtccttgc acttgacagc gattgtactt aagctcccag ggcgcgcttt 3240  
 gcttggaag gcacaggtag gaagcgcggg ctgccgggtg cacgctcgcc gccctgggag 3300  
 gagtctccct ccttggctc tcctttctgg gaactgccgg ctgtcccgta gcgttggcgg 3360  
 ttccagagtg cgggctgcac ggagaccgcg gcagcggccg gagagcccgg ccagcccct 3420  
 tcccacagcg cggcgggtgc ctgcccggcg ccatg 3455

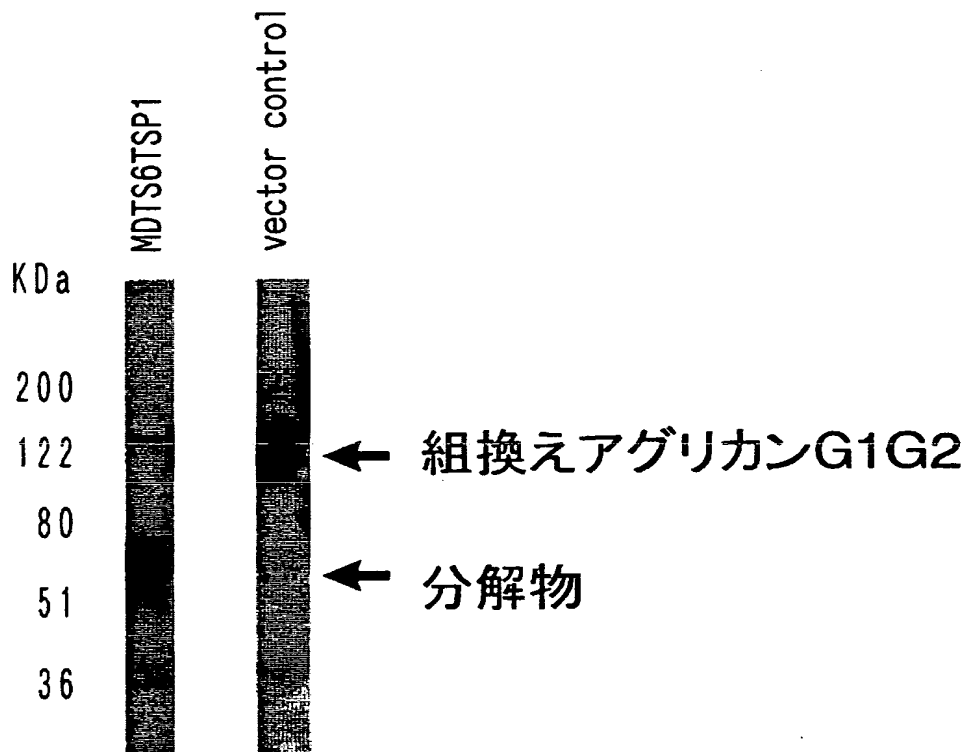


【書類名】 図面

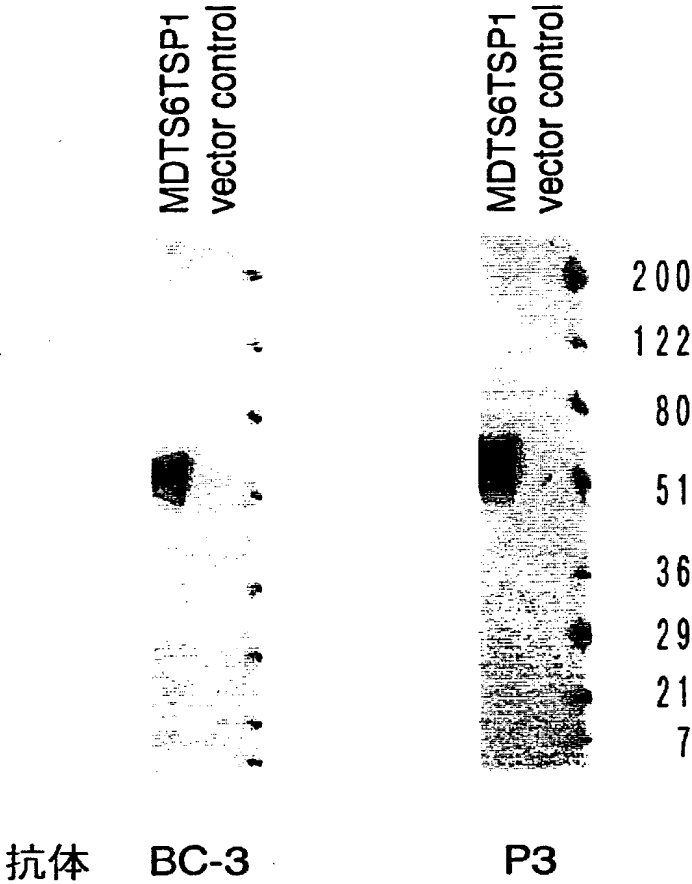
【図 1】



【図 2】

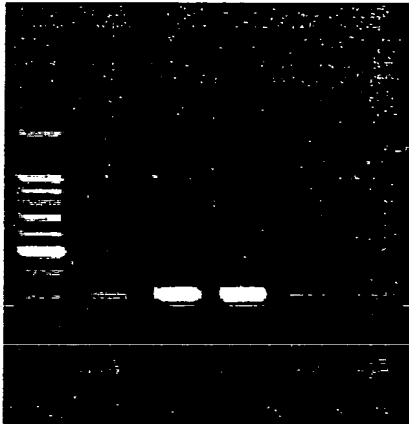


【図 3】

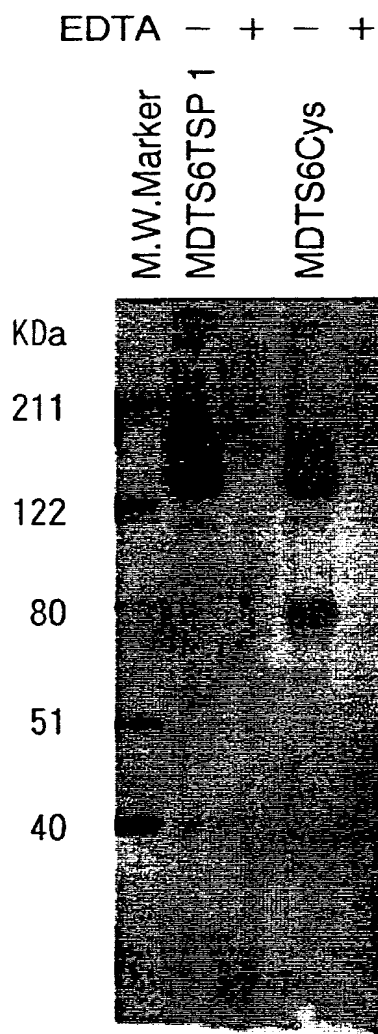


【図 4】

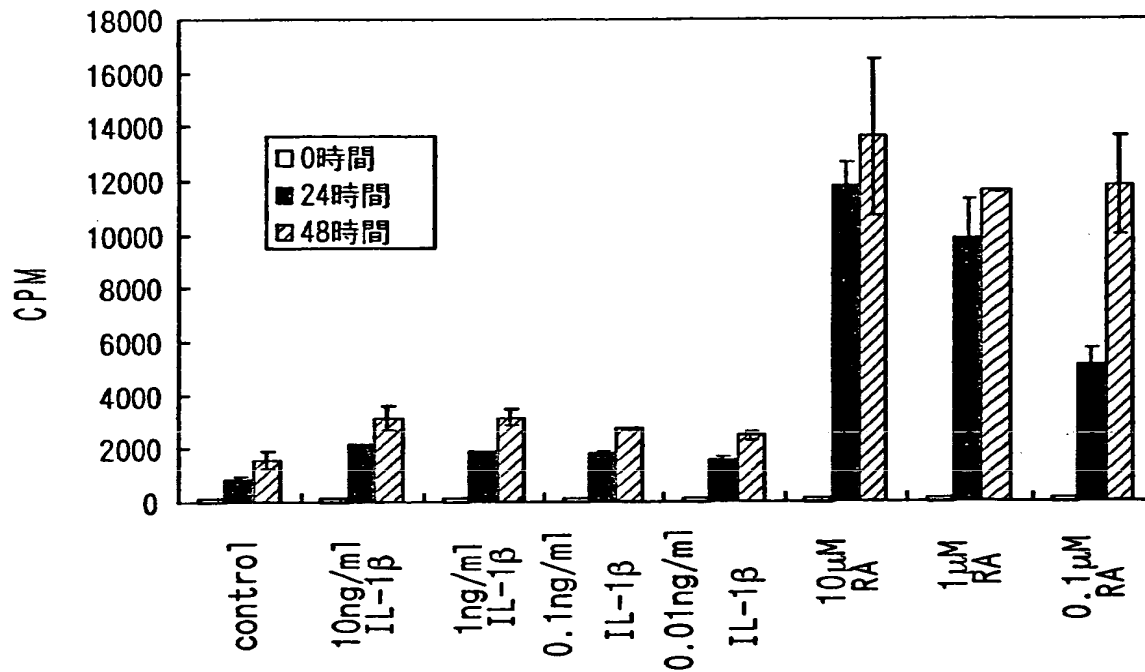
IL-1 処理 (時間) 0 1 2 4 8



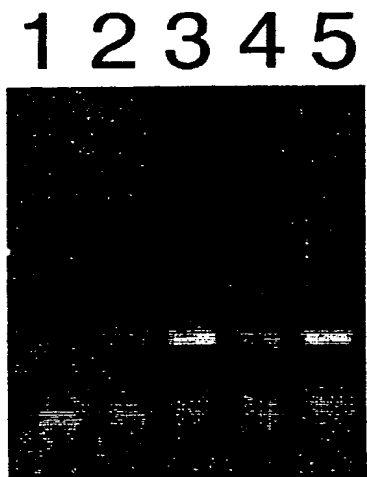
【図 5】



【図 6】

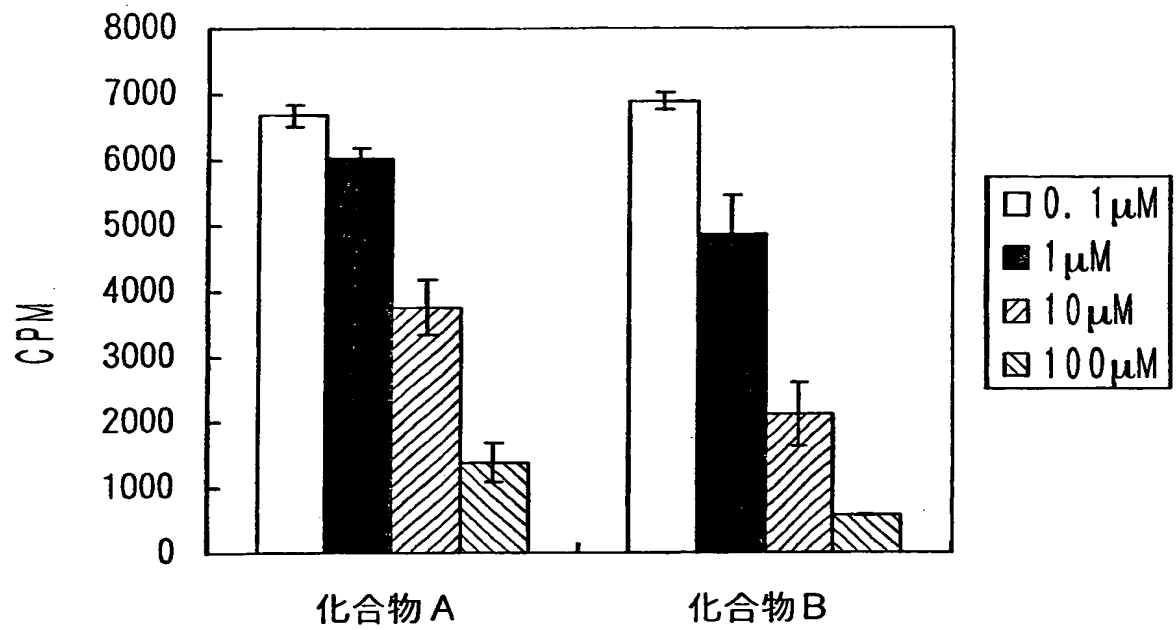


【図 7】



- 1: 非処理
- 2: IL-1 $\beta$  2時間処理
- 3: R.A. 2時間処理
- 4: IL-1 $\beta$  6時間処理
- 5: R.A. 6時間処理

【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 創薬標的分子としての可能性が非常に高い、新規ADAMTS蛋白をコードする遺伝子を単離・同定し、それらの活性を修飾する物質を探索するために必要となる組換え蛋白の提供。

【解決手段】 ADAMTSファミリーに分類される新規蛋白をコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、該蛋白を発現させた。該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同蛋白の製造法、及び、該蛋白及び該蛋白の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング法を確立した。

【選択図】 なし



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 1 4 4 0 2 0
受付番号	5 0 0 0 0 6 0 4 6 2 8
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7 0 6 8
作成日	平成 1 2 年 5 月 1 8 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000006677
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋本町 2 丁目 3 番 1 1 号
【氏名又は名称】	山之内製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	596175810
【住所又は居所】	千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 - 3
【氏名又は名称】	財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】	100088616
【住所又は居所】	東京都台東区浅草橋 3 丁目 2 0 番 1 8 号 第 8 菊 星タワービル 3 階 渡邊一平国際特許事務所
【氏名又は名称】	渡邊 一平

【選任した代理人】

【識別番号】	100089200
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬 株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	長井 省三

【選任した代理人】

【識別番号】	100098501
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬 株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	森田 拓

【選任した代理人】

【識別番号】	100109357
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬 株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	矢野 恵美子

次頁無

特2000-144020

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006677]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名 山之内製薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 6 1 7 5 8 1 0 ]

1. 変更年月日 1 9 9 6 年 1 2 月 5 日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 - 3

氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

